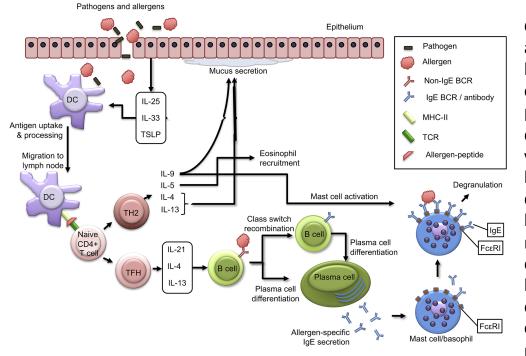
#### Fase di sensibilizzazione all'allergene



Gli allergeni che la attraversano barriera epiteliale sono captati, processati e presentati dalle cellule dendritiche che a loro volta migrano nei linfonodi drenanti dove presentano l'antigene ai linfociti T naive. П differenziamento dei linfociti T in Th2 e Tfh dipende dalla costimolazione e dalla presenza di particolari citochine.

#### La risposta anticorpale ad antigeni proteici necessita dell'aiuto dei linfociti T

dopo

parte

per

ha

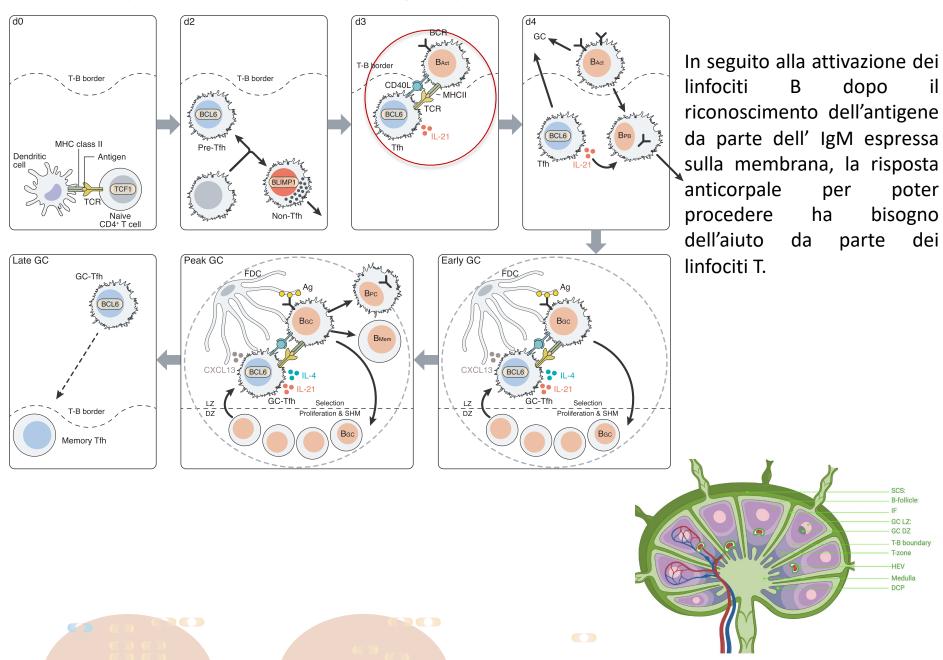
il

poter

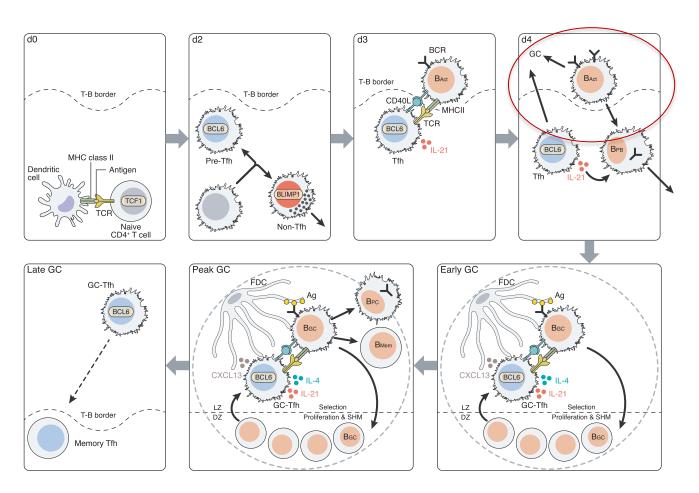
dei

bisogno

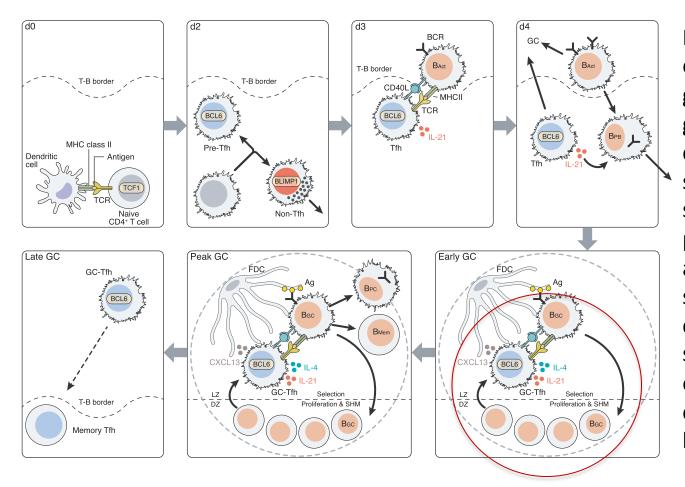
SCS: B-follicle: IF: GC LZ: GC DZ T-B boundary T-zone -HEV Medulla DCP



#### Cinetica e interazioni nella risposta dei linfociti Tfh e B



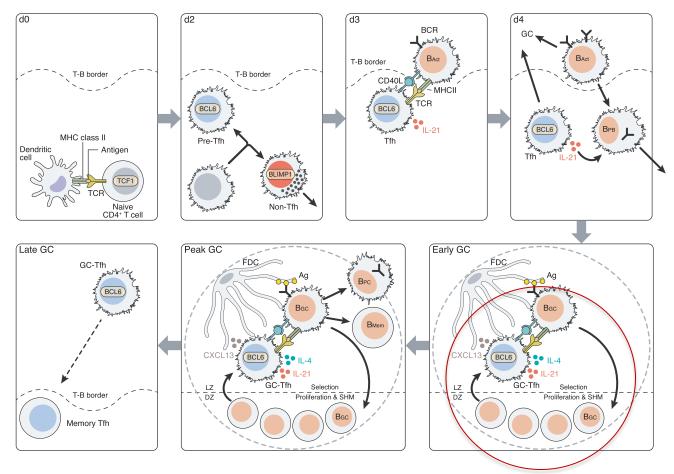
Nella zona di confine fra area T e B del linfonodo i linfociti interagiscono fra di loro. I linfociti B specifici per l'antigene lo captano е lo presentano ai linfociti Tfh. Questi ultimi attraverso l'interazione CD40L-CD40 е la produzione di citochine inviano al linfocita B i segnali necessari per la proliferazione il е differenziamento in plasmacellule e cellule В del centro germinativo ( $B_{GC}$ ).



I B<sub>GC</sub> entrano nel follicolo e iniziano a proliferare generando il centro germinativo che è costituito da una zona scura dove le cellule B attivamente sono proliferanti e dove avviene l'ipermutazione somatica e una zona chiara dove sono selezionati i linfociti che esprimono un recettore con elevata affinità per l'antigene (Early GC).



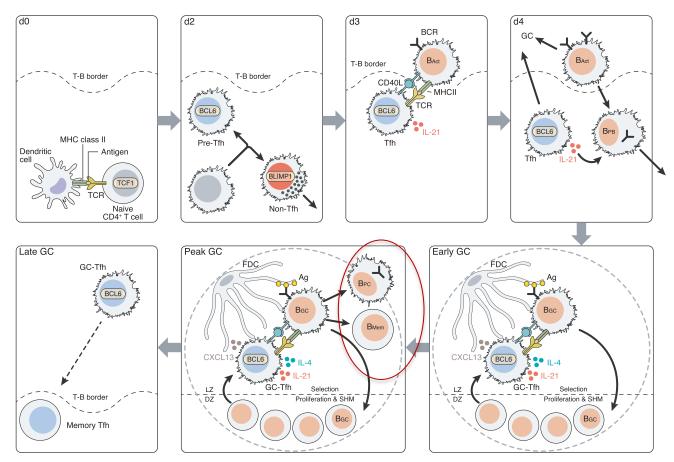




Saranno selezionati i linfociti B che sono in grado di presentare l'antigene a Tfh. Per questo saranno avvantaggiati i linfociti B che presentano un BCR con elevata affinità per l'antigene. I linfociti B che non ricevono segnali dai linfociti T andranno incontro a morte.





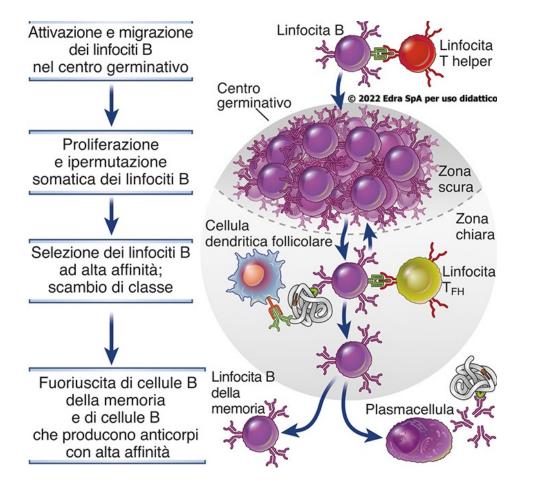


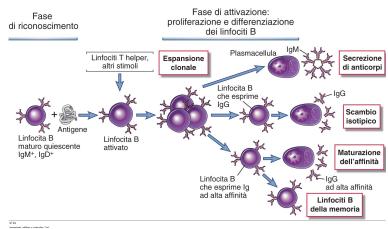
Nel centro germinativo linfociti Tfh oltre a L controllare la selezione dei linfociti B con alta affinità per l'antigene regolano anche lo sviluppo dell'immunità umorale a lungo termine il attraverso differenziamento delle  $\mathsf{B}_{\mathsf{CG}}$ in cellule plasmacellule a lunga vita e cellule B della memoria.



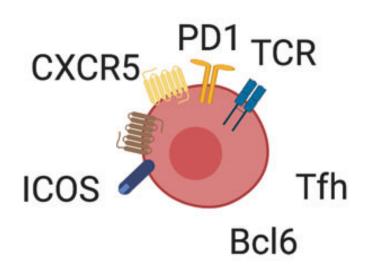


# Il centro germinativo





#### Caratteristiche dei linfociti T follicolari (TFH)



A partire dal 2000 è stata descritta una sottopopolazione di linfociti T helper specializzata nel cooperare con le cellule B nella produzione di anticorpi. Queste cellule definite linfociti T helper follicolari (Tfh) sono caratterizzate dall'espressione di CXCR5 (ligando CXCL13), PD-1, ICOS e il repressore trascrizionale BCL6 e dalla produzione di IL-21.

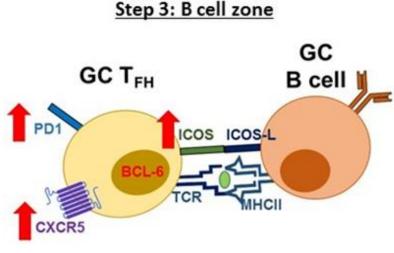
Le Tfh possono produrre anche IFN- $\gamma$  o IL-4.

#### I LU DILLELEUCIOL

Tfh are defined by expression of the transcription factor, B cell lymphoma 6 (Bcl6) and a number of cell surface markers including CXCR5, PD1 and ICOS. If h differentiation is a multi-step process, beginning in

#### the T cell zone of SLOs. Firstlv. naïve CD4<sup>+</sup> T cells recognize

Step 1: T cell zone sion of the transcription factor, B cell lymphoma 6 CXCR5, PD1 and ICOS. Tfh differentiation is a mult and disease the T cell zone of SLOs. Firstly, r unction has been shown to be dysregulated in a), prote or of diseases of excessive and strengthered in a), prote oution. Circulating TAPAUtional state between with the co ase in number in the and deformed by state between with the co ase in number in the and deformed by state between shown to be mmune diseases, in CIDI has selled in express Bcl-6 and ematosus and rheur between the protection of the protection of variable immune diseases in circulation and the protection of the protection of the non variable immune diseases in circulation of the protection of the non variable immune diseases of the protection of the protection



ented on N ong with ecule, ICO nals to the h lineage. CXCR5 and owing the B cell zone over to s allowing to express CXCR5, IC

ating Tfh and major defeets in the down over to and PD1 and move to the y, defects in Tfh help to B cells has been observed in HIVain to the defeet of the defeation of the PD1 and move to the ity of patients to preduce affective by appecific antibodies within the defeation of the second of the

# forpresentatoulin associazione Ralled made code.

native Tfh dition to Tfh expressing the CD4 correceptor, a population of T cells expressing the CD8 correceptor cellule been found to express CXCR5, PD1 and Bcl-6. They have been demonstrated in the esteril for the store in the s alle g both acute and chronic lymphocytic choriomeningitis the state the state of the st DC alla e lation is currently being studied by multiple research groups. It will be interesting to determine their rtance to protective immunity. rtance to protective immunity. ed litespressione di BCL-6 indirizza il e

number or diseases or excessive or insurricient antibody offferenziamento delle cellule verso i Tfh. increase in number in the blood of patients with

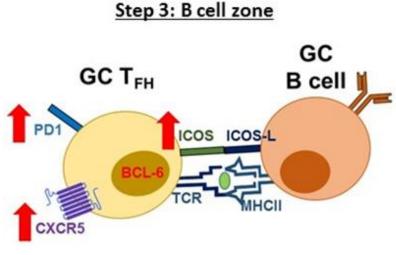
#### I FN DIFFEFERICIACION

Tfh are defined by expression of the transcription factor, B cell/ymphoma 6 (Bcl6) and a number of cell surface markers including CXCR5, PD1 and ICOS. The differentiation is a multi-step process, beginning in

#### the T cell zone of SLOs. Firstly. naïve CD4<sup>+</sup> T cells recognize

### Step 1: T cell zone

sion of the transcription factor, B cell lymphoma 6 CXCR5, PD1 and ICOS. Tfh differentiation is a mull the T cell zone of SLOs. Firstly, r and disease 🖣 Inction has been shown to be dysredutated in a, prote er of diseases of excessive or algorite the stand the co uction. Circulating TAPAULIAN STREAM LALING CO ase in number in the and be of saking and uction by mmune diseases, in (IDA a selle aic x pp as Bcl-6 and ematosus and rheurDatvatop ingitish Pax jands switch che non variable immunøbeligie agy tate they heafokine ru ency have been shown the texe and stelle a dell zo



ented on M ong with ecule, ICO nals to the <sup>-</sup>h lineage. CXCR5 and lowing the B cell zone over to s allowing to express <sup>1</sup> CXCR5, IC

XCR5, PD1 and ICOS.

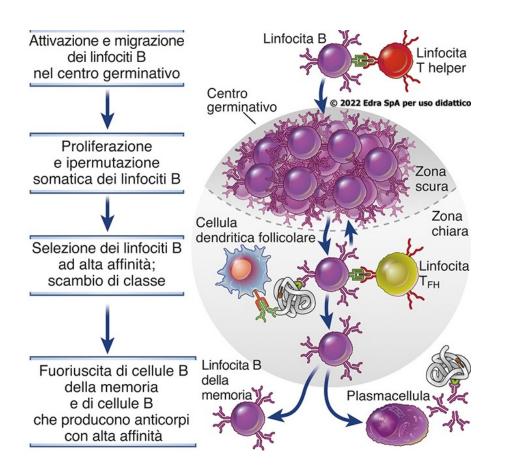
ating Tfh and major குதிதைத்துக்கு மானு குதித்து குதுது குதுதியில் பிருந்து குதுதை குதுது குதுது குதுது குதுது y, defects in Tfh help to B cells has been observed in HIVartiented in the same of the same of the transformer of the transform ity of patients to preduce af is deve by dee cific antibodies deve by the proversion of the book of the proversion of the book of the proversion of the proversion of the proversion of the proversion of the provest of man diseases, better understanding of these cells could an are the second s ermore, the production of long lasting specific antibodies for the basics of successful decailed how interfector a fore a great deallof research is being carried out to better understand. If to improve vaccine design highest level

#### native Tfh

form GCs and fully MHC di classe II da parte dei B differentiated In within the co-receptor The cho dition to Tfh expressing the CD4 conseceptor, a population of the part of the conseceptor g both acute and chronic lymphocytic choriomeningitis fills a set of the set ICOS е e lation is currently being studied by multiple research groups groups groups and erasting at drazione their centro rtance to protective immunity. ed germinativo. La segnalazione da parte di

number of diseases of excessive of insufficient antiposity ha un ruolo importante nel production. Circulating Tfh numbers have been shofferenziamento dei Tfh. increase in number in the blood of patients with

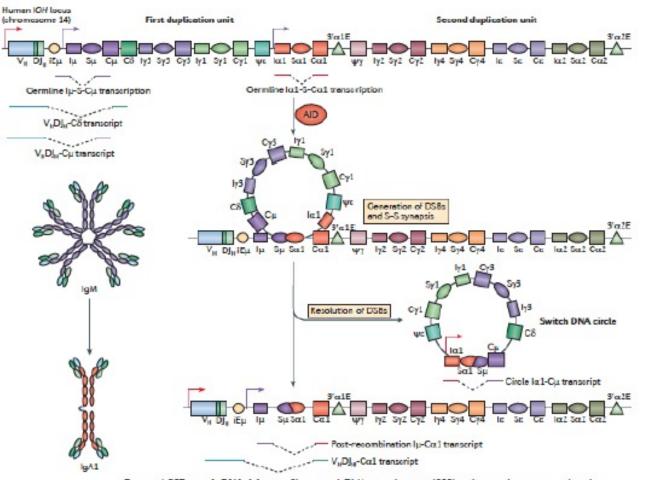
# Il centro germinativo



Nel corso della risposta anticorpale saranno prodotti anticorpi di diverso isotipo e con aumentata affinità per l'antigene.

Questo è reso possibile da due processi: lo scambio isotipico e l'ipermutazione somatica.

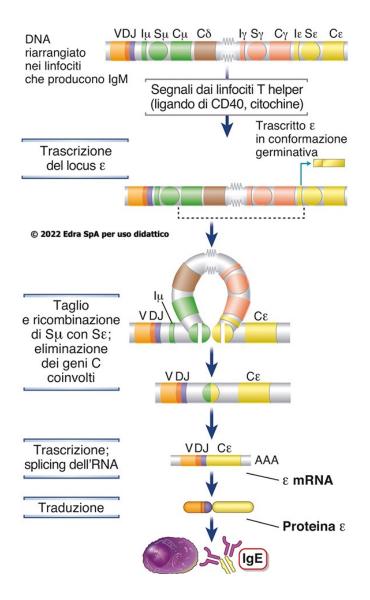
#### Commutazione di classe delle Immunoglobuline



La commutazione di classe è il processo che permette che una parte dei linfociti В attivati produca anticorpi stessa con specificità per l'antigene e diversa regione costante (isotipo). La commutazione di classe avviene attraverso la sostituzione di un cluster costante (es:  $C\mu$ ) con un altro cluster (es:  $C\gamma$ ).

Figure 1 | CSR entails DNA deletion. Class-switch DNA recombination (CSR) exchanges the gene encoding the immunoglobulin heavy chain constant region ( $C_{\mu}$ ) with one of a set of downstream  $C_{\mu}$  genes (the figure depicts CSR between Sµ and Sū1 in the human immunoglobulin heavy chain (IGH) locus). This deletion-recombination reaction requires activation-induced cytidine dearninase (AID) and involves the generation of DNA double-strand breaks (DSBs) in switch (S) regions (which lie upstream of the  $C_{\mu}$  gene) followed by DSB repeir. This leads to the juxtaposition of rearranged  $V_{\mu}DJ_{\mu}$  DNA (which encodes the heavy chain variable region) with a downstream  $C_{\mu}$  exon cluster and deletion of the intervening sequence between S regions an extrachromosomal circle.  $\Psi$ , pseudogene; 3'úE, 3'ú enhancer; iE $\mu$ , ICH intronic enhancer; I, GH intervening region.

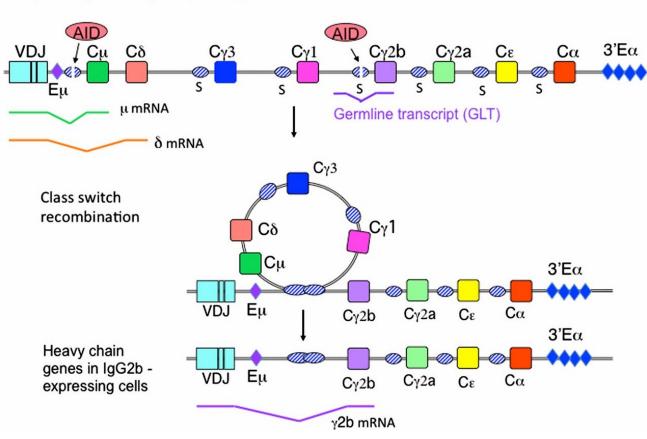
## **Commutazione di classe/switch isotipico/della catena pesante**



Lo scambio di classe è un processo di ricombinazione in cui la regione del DNA che codifica per la regione costante della catena pesante della immunoglobulina viene tagliata e ricombinata in modo tale per cui l'esone VDJ che codifica per la regione V viene posto accanto ad una regione costante più a valle ed il DNA interposto eliminato

Lo scambio isotipico è regolato dalle citochine prodotte dai linfociti T helper follicolari e dalla interazione CD40 (espresso sui linfociti B) con il CD40 ligando (CD40L) espresso dai linfociti Tfh attivati.

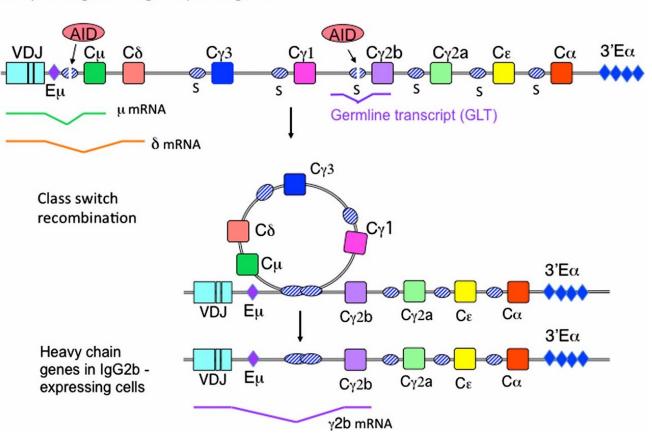
Lo scambio isotipico verso le IgE richiede la citochina IL-4.



Heavy chain genes in IgM expressing cells

Nello scambio isotipico gli eventi di ricombinazione coinvolgono sequenze nucleotidiche che sono presenti al 5' di ogni locus C<sub>H</sub> che sono definite switch regions.

Queste sequenze presentano un esone (iniziatore della trascrizione) preceduto da una regione promotrice. Affinchè possa avvenire la ricombinazione fra le di switch è sequenze necessario che avvenga la delle trascrizione Tali I-S-C. sequenze trascritti germinativi non sono tradotti in proteine.



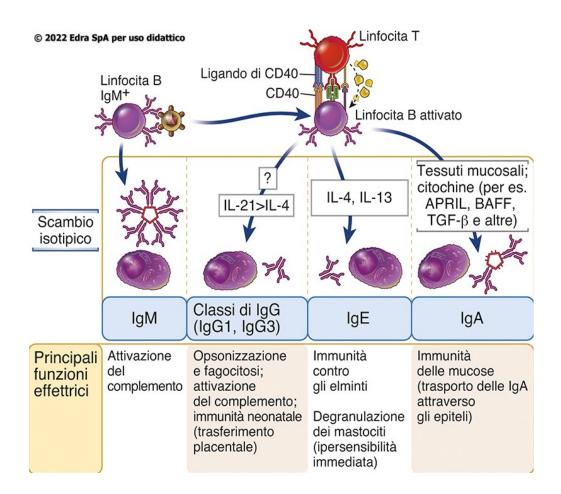
Heavy chain genes in IgM expressing cells

I trascritti germinativi sono presenti a livello del locus  $\mu$  che del locus della catena pesante coinvolta nello scambio isotipico.

trascritti germinativi permettono la formazione di catene ibride DNA-RNA con un filamento di DNA lasciando libero l'altro filamento sul quale AID agirà l'enzima (activation induced deaminase) responsabile dello scambio isotipico. l'interazione fra CD40 e CD401 induce

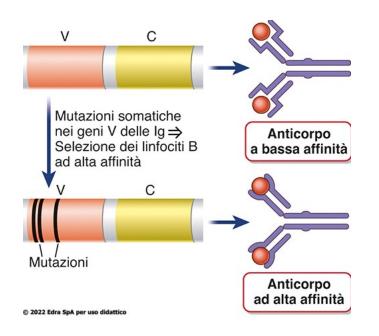
l'espressione di AID.

### Ruolo delle citochine nello switch isotipico

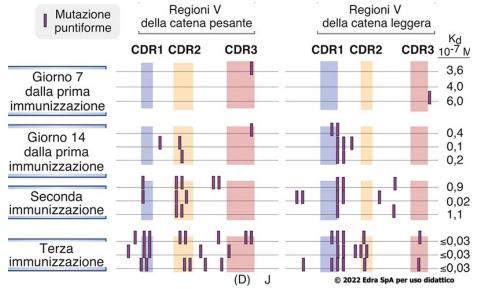


Le citochine avviano lo scambio di classe attivando la trascrizione dei trascritti germinativi. In particolare l'IL-4 e l'IL-13 promuovono lo switch isotipico da IgM a IgE.

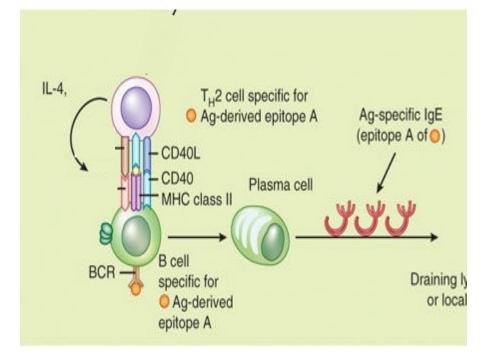
#### Ipermutazione somatica



Nei linfociti B della zona scura che stanno proliferando i geni V che codificano per la regione variabile dell'immunoglobulina vanno incontro a mutazioni puntiformi con elevata frequenza.



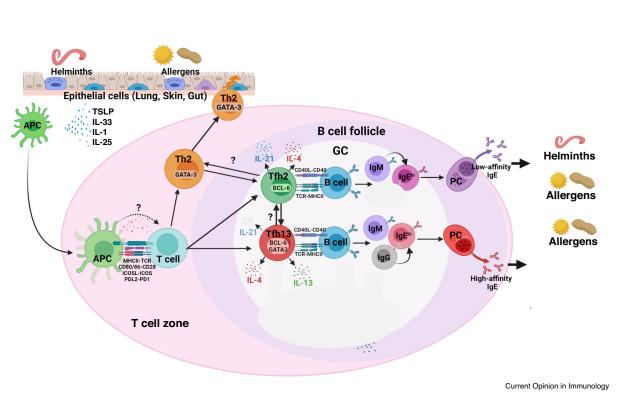
# I linfociti Tfh attivano i linfociti B specifici per l'allergene e inducono la produzione di IgE



La generazione della risposta anticorpale lgE necessita dell'aiuto dei T helper e della IL-4. Per molto tempo i Th2 che producono IL-4 sono state considerate le cellule responsabili della risposta IgE. Recentemente esperimenti in topi deficienti in BCL6, che abroga lo sviluppo dei Tfh, hanno dimostrato l'importanza di tali cellule nella produzione di IgE allergene specifiche.

In base a questi dati si ritiene che nel corso delle risposte agli allergeni i Tfh agiscano nel sostenere la risposta IgE mentre i Th2 nel mediare la risposta infiammatoria di tipo 2.

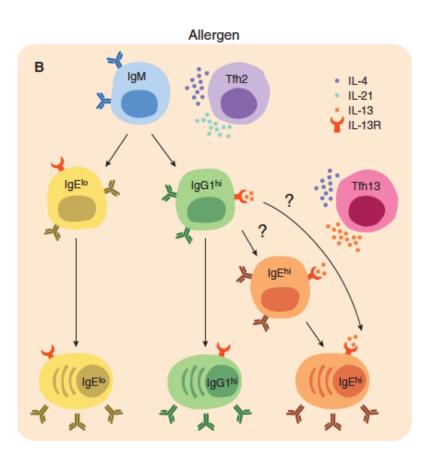
# I linfociti Thelper follicolari allergene specifici inducono i linfociti B a produrre IgE specifiche per l'allergene



Studi recenti hanno dimostrato che la produzione di IgE anche in risposte fisiologiche come quelle verso gli elminti richiede le Tfh producenti IL-4 denominate Tfh2. La cooperazione da parte Tfh2 delle cellule producenti IL-4 promuove la produzione di IgE da parte dei linfociti B.

E' stato dimostrato che gli allergeni inducono IgE ad alta affinità che invece sono raramente prodotte nelle risposte fisiologiche.

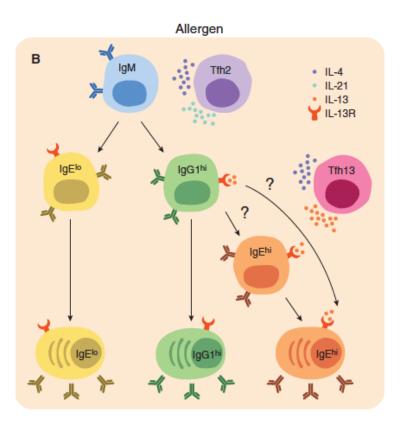
# Modello dell'induzione di IgE durante l'esposizione all'allergene



Durante la fase di sensibilizzazione all'allergene (modelli animali con allergeni inalati o ingeriti) sono indotte Tfh2 in grado di produrre IL-4. Più recentemente è stata identificata una popolazione di Tfh producenti IL-4 e IL-13 ed esprimenti GATA3 e BCL6 denominata Tfh13.

La perdita di tali cellule nel modello murino determina un difetto nella induzione di IgE allergene specifiche. Attualmente è stato proposto che le Tfh2 mediano lo switch verso IgE a bassa affinità mentre le Tfh13 mediano lo switch verso le IgE ad alta affinità.

### Modello dell'induzione di IgE durante l'esposizione all'allergene



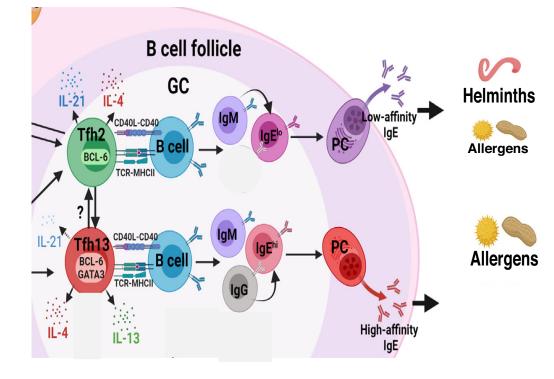
Mentre l'IL-4 media lo switch dell'immunoglobulina diretto da IgM a IgE, l'IL-13 potrebbe essere coinvolta nello switch sequenziale da IgG1 a IgE. Lo switch sequenziale IgG - IgE determina la generazione di IgE ad alta affinità che sono indotte dagli allergeni. Le cellule IgE+ nel centro germinativo sono rare

Lo switch a IgE avviene nel CG ma la maggior parte delle cellule B IgE+ differenziano in plasmacellule che lasciano il CG.

Le IgE con aumento della affinità avviene attraverso uno switch sequenziale da IgM a IgG e poi a IgE. Lo switch diretto IgM-IgE genera IgE a bassa affinità.

Cellule B della memoria IgE sono rare. In seguito a re-incontro con l'antigene le cellule B della memoria IgG1 differenziano in plasmacellule secernenti IgE.

## Produzione di IgE nella fase di sensibilizzazione



Nella fase di sensibilizzazione sono generate sia Tfh2 che Tfh13. Queste ultime sono unicamente indotte nelle condizioni allergiche.